

STRESZCZENIE

Patotyp EAEC obejmuje szczepy *E. coli* o charakterystycznym agregacyjnym typie adhezji do komórek nabłonka. Szczepy te na podstawie badań epidemiologicznych prowadzonych na całym świecie uznane zostały za chorobotwórcze dla ludzi. Najczęściej odpowiadają one za przewlekłe biegunki, co oznacza, że mają zdolność długotrwałego utrzymywania się w jelicie zakażonych osób. To również oznacza, że nieswoiste mechanizmy obronne, w które obfituje błona śluzowa przewodu pokarmowego nie potrafią skutecznie eliminować tych drobnoustrojów. Dotychczas fakt ten wiązany był ze zdolnością EAEC do stymulacji sekrecji dużych ilości śluzu w jelicie, w którym szczepy te tworzą biofilmu. Jednakże, dotychczas nie badano szczegółowo interakcji EAEC z makrofagami. W piśmiennictwie naukowym jest na ten temat tylko jedna publikacja. Stąd celem zaplanowanych badań była ocena wzajemnych interakcji pomiędzy EAEC a makrofagami, mogąca wyjaśnić potencjalną zdolność tych szczepów do wywoływania przewlekłych zakażeń przewodu pokarmowego u ludzi.

Do badań wykorzystano 5 wybranych losowo szczepów EAEC izolowanych od osób dorosłych z rozpoznanym zespołem jelita nadwrażliwego (IBS), u których najpierw ustalono cechy fenotypowe i genotypowe. Wszystkie te szczepy wykazały agregacyjny typ adhezji do ludzkich komórek nabłonka jelita oraz zdolność inwazji. Trzy (60%) z tych szczepów posiadało gen *aggR*, kodujący aktywator transkrypcyjny, na podstawie, którego szczepy EAEC są kategoryzowane jako typowe *aggR*-dodatnie oraz atypowe *aggR*-ujemne. Wszystkie te szczepy posiadały również geny kodujące inwazyjne opisanego wśród pałeczek *E. coli*. Badanie stopnia fagocytozy tych szczepów przez ludzkie monocyty różnicowane w makrofagi wykazało, że szczepy te, w przeciwieństwie do referencyjnych szczepów *E. coli*, reprezentujących różne patotypy *E. coli*, są bardzo słabo fagocytowane przez makrofagi, a także utrzymują się i mnożą w komórkach żernych. Poszukiwania antygenów, które mogły odpowiadać u badanych szczepów EAEC za te zdolności nie wskazały jednoznacznie żadnego konkretnego antygeny, choć badano systemy antyoksydacyjne, wybrane systemy wychwyty jonów żelaza, hydrofobowość powierzchni oraz ekspresję fimbrii tzw. powszechnych MS1. Antygenami, które prawdopodobnie mogły wpływać na słabą fagocytozę tych szczepów oraz ich przeżywanie w makrofagach były fimbrie MS1, hydrofilowość powierzchni oraz systemy wychwyty jonów żelaza – yersiniobaktyna i białko wiążące hem ChuA.

Ponieważ makrofagi po sfagocytowaniu drobnoustrojów podlegają apoptozie, w dalszych badaniach oceniano poziom apoptozy makrofagów zakażonych badanymi szczepami *E. coli*. Apoptozę makrofagów badano trzema różnymi technikami tj. mikroskopowo po zabarwieniu bromkiem etydyny i oranżem akrydyny, cytometrycznym i elektroforetycznym oznaczeniem degradacji DNA oraz immunoenzymatycznym oznaczeniem stężenia cytochromu *c*. Pomimo, że uzyskane wyniki wykazały pewne rozbieżności pomiędzy zastosowanymi

technikami, generalnie wskazały, że badane szczepy EAEC indukowały apoptozę małego odsetka makrofagów. Wyniki te zainicjowały dalsze badania apoptozy makrofagów zakażonych szczepami *E. coli*, a następnie poddanych działaniu induktora apoptozy, staurosporyny. Zgodnie z założeniem, odsetek apoptotycznych makrofagów powinien znacznie wzrosnąć po zastosowaniu staurosporyny, tymczasem jednak zaobserwowano niewielki wzrost apoptozy makrofagów, niższy niż przypadku działania samego induktora. W związku z tym, u wszystkich szczepów oznaczono geny kodujące białka NleH i OpmA, które mogły hamować apoptozę makrofagów. Wszystkie badane szczepy posiadały gen kodujący białko OmpA, ale brak genów dla białek NleH. Ponieważ w pracy badano jedynie obecność genu *ompA*, niemożliwa jest ocena, czy białko OmpA faktycznie odpowiada za hamowanie apoptozy makrofagów.

Biorąc pod uwagę, że badane szczepy EAEC indukowały apoptozę bardzo niskiego odsetka makrofagów, także po zadziałaniu staurosporyny, uzyskane wyniki wskazują na hamowanie przez EAEC apoptozy makrofagów indukowanej fagocytozą oraz staurosporyną. Zdolność przeżywania w makrofagach szczepów EAEC może być cechą umożliwiającą tym patogenom wywoływanie przewlekłych zakażeń jelit.

SUMMARY

EAEC pathotype includes *E. coli* strains of characteristic aggregative adherence pattern to epithelial cells. These strains are considered pathogenic to humans upon epidemiological study performed worldwide. Most commonly infection with EAEC causes persistent diarrhea meaning that these strains have the ability to persist for a long time in the intestine of infected individual. That also means that nonspecific immune mechanisms, which are abundant in the intestinal mucosa, cannot effectively eliminate these pathogens. Since EAEC induces mucus secretion in the intestine and forms biofilm embedded within the mucus, both these factors were considered responsible for the persistent nature of infections they produce. However, so far the interactions of EAEC with macrophages were not studied in details and there is only one article on EAEC phagocytosis. Thus, the aim of the present study was to evaluate the interaction of EAEC with macrophages which could explain their capability to cause persistent infections in humans.

In the study a five randomly chosen EAEC strains from adults with irritable bowel syndrome were examined. First, phenotypic and genotypic characteristics of these strains were established. All these strains adhered to human intestinal epithelial cells in an aggregative pattern and all showed the ability to invade the epithelial cells. Three (60%) of these strains carried the *aggR* gene allowing their categorization into typical *aggR*-positive strains. All EAEC examined carried genes encoding invasions specific to *E. coli*. All these strains were poorly phagocytosed by human monocytes differentiated into macrophages in contrast with reference *E. coli* strains representing different pathotypes. Moreover, the EAEC strains were able to survive and multiply within macrophages. Screening for EAEC antigens responsible for the survival and multiplication within macrophages did not indicate any specific factor, although antioxidative systems, iron capture systems, surface hydrophobicity and expression of common pili MS1 were examined among these strains. Factors most probable associated with the abilities of EAEC studied were MS1 pili, hydrophilic surface and iron sequestering systems – yersiniobactin and hem binding protein ChuA.

As phagocytosis of microorganisms induce also the phagocyte apoptosis, the further study concentrated on apoptosis of macrophages infected with EAEC strains. The apoptosis of macrophages was assessed by three different assays i.e. microscopically after staining with ethidium bromide and acridine orange, DNA degradation estimated by flow cytometry and electrophoresis, and by immunoenzymatic assay for cytochrome *c* concentration. Although the results obtained showed some divergences among techniques used, generally they indicated that EAEC induce apoptosis of small percentage of macrophages. These results prompted to further study of apoptosis of macrophages infected with EAEC and then treated with apoptosis inductor i.e. staurosporine. According to the assumption the percentage of apoptotic macrophages should

increase after the treatment with staurosporine. However although there was an increase in the percentage of apoptotic macrophages, as before, it was much lower than in case of apoptosis inducer itself. Thus, genes encoding NleH and OmpA proteins that are known inhibitors of cells apoptosis were designated among EAEC strains. All EAEC examined carried the *ompA* gene, but none of these strains carried genes encoding NleH proteins. As in the current study only the presence of the *ompA* gene was assessed, but not its expression, it is difficult to say how much the OmpA protein was involved in the apoptosis of macrophages infected with EAEC strains.

Taking into consideration that EAEC examined induced apoptosis of a small percentage of macrophages, even after treatment with staurosporine, the results obtained indicated that EAEC strains inhibited macrophage apoptosis induced by phagocytosis and staurosporine. The ability may be responsible for the persistent nature of infections caused by these pathogens.